

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-527753

(P2002-527753A)

(43) 公表日 平成14年8月27日 (2002.8.27)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	B 4 B 0 2 4
			D 4 B 0 6 3
C 0 7 K 14/585		C 0 7 K 14/585	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/09		C 1 2 P 21/02	C 4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/02		C 1 2 Q 1/37	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-576286(P2000-576286)  
 (86) (22) 出願日 平成11年10月13日 (1999.10.13)  
 (85) 翻訳文提出日 平成13年4月16日 (2001.4.16)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP99/07692  
 (87) 国際公開番号 WO00/22439  
 (87) 国際公開日 平成12年4月20日 (2000.4.20)  
 (31) 優先権主張番号 198 47 690.6  
 (32) 優先日 平成10年10月15日 (1998.10.15)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)  
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), JP, US

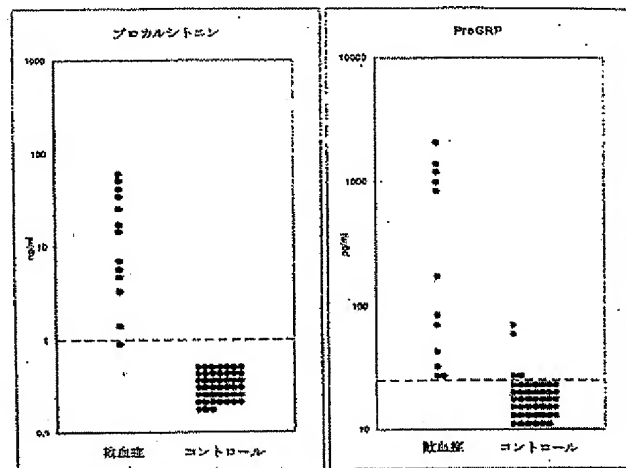
(71) 出願人 ベー・エル・アー・ハー・エム・エス・デアグノスティカ・ゲーエムベーハー  
 ドイツ・D-16761・ヘーニッヒスドルフ・ノイエンドルフシュトラッセ・25  
 (72) 発明者 アンドレアス・ベルグマン  
 ドイツ・D-12351・ベルリン・パウムロイファーヴェーク・47  
 (72) 発明者 ヨアヒム・シュトルック  
 ドイツ・D-12161・ベルリン・ホルシュタイニッシェ・シュトラッセ・28  
 (74) 代理人 弁理士 志賀 正武 (外7名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 敗血症及び敗血症様全身性感染の診断及び治療のための方法及び物質

## (57) 【要約】

敗血症疾患の診断及び治療、及び、プロカルシトニン以外のプロホルモン並びにジペプチジルペプチダーゼIVの測定における、並びに、敗血症の診断でのバイオマーカーとしての、組み換えプロカルシトニン3-116の使用。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 敗血症及び重度の感染、特に敗血症様全身性感染の、鑑別診断的早期検出、並びに、重症度の評価及びその治療処置の達成度の評価のための検出方法であって、プロカルシトニン以外の少なくとも1つのペプチドプロホルモンの含量、及び／又は、それから導かれる部分ペプチドであって前記ペプチドプロホルモンから得ることのできる成熟ホルモンではない部分ペプチドの含量が、患者の生理的流体サンプル中で測定され、敗血症又は敗血症様感染の存在、その重症度、及び／又は、治療処置の達成度が、測定された前記ペプチドプロホルモンの存在及び／又は検出量から決定することを特徴とする方法。

【請求項2】 前記ペプチドプロホルモンが、プローガストリン放出ペプチド (proGRP)、プローエンドセリン-1 (pro-END)、プロー脳ナトリウム排泄増加性ペプチド (pro-BNP)、プロー心房性ナトリウム排泄増加性ペプチド (pro-ANP又はpro-ANF)、プローレプチン、プローニューロペプチド-Y、プローソマトスタチン、プローニューロペプチド-Y Y又はプローアドレノメデュリン (pro-ADM) からなる群から選択されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 ジペプチジル-アミノペプチダーゼ (DP-IV又はDAP-IV又はCD 26) によってジペプチドがペプチドの末端から切り取られ得るために、そのアミノ末端で該ジペプチドを欠くことによって既知の完全なペプチドプロホルモンとは異なる部分ペプチドが、測定によって検出されることを特徴とする請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 前記ジペプチドが、Xaa-Proジペプチドであり、Xaaが完全なプロホルモンペプチドのアミノ末端アミノ酸であることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項5】 前記ペプチドプロホルモンの前記測定がイムノアッセイ又は沈降アッセイとして行われ、且つ、敗血症又は重度の敗血症様感染の存在の診断が、測定された該ペプチドプロホルモン濃度が、健常者に見られる同じプロホルモンの値よりも有意に高い場合に行われることを特徴とする、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】 敗血症及び重度の感染、特に敗血症様全身性感染の、鑑別診

断的早期検出のため、検出のため、及び、重症度の評価のため、及び、その治療処置の達成度の評価のための方法であって、ジペプチジル-ペプチダーゼIV(DP IV; ジペプチジル-アミノペプチダーゼIV; DAP IV又はCD 26)が患者血清又は血漿中で測定され、且つ、敗血症又は敗血症様全身性感染の存在が、健常者と比べて有意に減少しているジペプチジル-ペプチダーゼIVの濃度に基づいて診断されることを特徴とする方法。

【請求項7】 遺伝子工学によって調製されたプロカルシトニン3-116

。【請求項8】 遺伝子工学によるプロカルシトニン3-116の調製方法であって、

—プロカルシトニン3-116の114のアミノ酸をコードしているcDNAを適当なベクターに挿入し、

—形成した該ベクターを用いて、適当な宿主細胞を形質転換させ、プロカルシトニン3-116を発現させ、

—前記宿主細胞を刺激し、

—発現したプロカルシトニン3-116を含むフラクションを回収し、そして、

—前記フラクションから、遺伝子工学によって調製された生成物として、クロマトグラフィーによる精製によって、少なくとも90%の純度で前記プロカルシトニン3-116を得る

ことを含む方法。

【請求項9】 プロカルシトニンアッセイにおける標準物質として、又は、敗血症及び敗血症様全身性感染の予防及び処置のための治療の準備のための、組み換えプロカルシトニン3-116の使用。

【請求項10】 症状とは無関係な診断上のパラメーターとしてのプロカルシトニン3-116の測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、敗血症及び敗血症様全身性感染において、プロカルシトニン又はプロカルシトニンの部分ペプチド (partial peptides) の発生に関係する、新規な、実験的に確認された発見から導かれる、新規な診断及び治療の可能性に関する。

## 【0002】

## 【従来技術】

特許DE 42 27 454及びEP 0 656 121 B1及びUS 5,639,617は、敗血症の危険を有する患者及び敗血症の典型的な症候が見られる患者の血清又は血漿中のプロホルモンのプロカルシトニン及びそこから得られる部分ペプチドの測定が、早期検出によって、すなわち敗血症に至らしめるかもしれない感染の検出及び非感染性の病因との鑑別、重大性の検出、及び、敗血症及び敗血症様全身性感染の治療の成果の評価によって、有益な診断手段であること開示している。前記測定は、全身性微生物感染に起因する症状を非感染性の病因の他の症状から区別するための診断に特に有益であることが証明されており、該非感染性病因の他の症状とは、敗血症を示唆するかもしれないが、実際には全身性微生物感染に起因しないものであって、それらの臨床像によるが、例えば、個々の器官の非感染性炎症から、術後の拒絶反応又はガンまでの症状である。さらに、全身性炎症は局所性炎症とは区別され得る。

## 【0003】

より最近の発見の概要としては、W. Karzaiらのin Infection, Vol 25 (1997), 6, 329-334頁及びそこに引用もしくは言及されている更なる技術文献を参照することができる。

## 【0004】

## 【発明が解決しようとする課題及び課題を解決するための手段】

プロカルシトニンは、カルシトニンのプレホルモンとして既知となっており、その完全なアミノ酸配列は古くから知られている (FEBS 167 (1984), 93-97頁)

。プロカルシトニン<sup>®</sup>は、甲状腺のC細胞において、通常の状態で作成されており、それから、特異的開裂によってホルモンのカルシトニンになり、さらに、部分ペプチドのカタカルシン及び57のアミノ酸を含むN-末端残基（「アミノプロカルシトニン」）となる。

#### 【0005】

敗血症の間のプロカルシトニンの生成に重要である器官もしくは細胞又は組織に関する実験資料によってサポートされているものもいくつか存在する前記技術文献中には異なる意見もあるが、敗血症のケースでは、甲状腺を完全に除去した患者からでさえも、著しく高いプロカルシトニンレベルが観察されることもあるので、敗血症患者の血中に検出可能なプロカルシトニンが、甲状腺の外で形成されると結論付けることが必要であった。

#### 【0006】

敗血症において「プロカルシトニン」として測定されるペプチドの性質に関して、実際、その特定のペプチドが、甲状腺においてカルシトニン前駆体として形成される完全な長さの既知のプロカルシトニンと完全に同一である必要はないことは、上述の患者におけるアウトセットから明らかにされている。しかしながら、敗血症のケースで形成されるプロカルシトニンが甲状腺で形成されるプロカルシトニンと異なるのかどうかという疑問は、現在まで答えが得られていない。あり得る違いは、既知のプロカルシトニンの、糖化（グリコシレーション）、リン酸化あるいは一次構造の修飾等の翻訳後の修飾、さらに、変性した、短くされたあるいは長くされたアミノ酸配列であった。今日まで分析アッセイ方法は、カルシトニン前駆体として既知のプロカルシトニンと、敗血症の場合に形成されるプロカルシトニンとの間の違いを明らかにしなかったので、敗血症のケースで形成されるプロカルシトニンは、カルシトニン前駆体と同一であり、ゆえに、既知の116アミノ酸のプロカルシトニン配列を有するペプチド（プロカルシトニン1-116）であると暫定的、一般的に見なされていた。

#### 【0007】

しかしながら、出願人の研究室における測定によって明らかにされ、本出願の実験部分により詳細に説明されているように、敗血症のケースで形成されるプロ

カルシトニンとは、甲状腺で形成される完全なプロカルシトニン1-116とは、わずかだが重大な違いがある。見出された違いは、それから、新規な診断及び治療方法、そこで使用可能な物質、及び、遂行され得る科学的アプローチにおいて実施可能な多数の科学的結論を導き出した。

#### 【0008】

本出願において開示される発明の開始点は、敗血症及び敗血症様全身性感染のケースにおいて患者血清中に比較的高濃度で検出可能なプロカルシトニンが、116のアミノ酸を含む完全なプロカルシトニン1-116ではなく、そのアミノ末端がジペプチド分短くなっているが他は同一であり、114のアミノ酸のみのアミノ酸配列を有するプロカルシトニン（プロカルシトニン3-116）であるという驚くべき発見である。

#### 【0009】

完全なプロカルシトニンと比べて欠落している前記ジペプチドは、Ala-Pro構造を有している。完全なプロカルシトニン配列のアミノ末端の二番目のアミノ酸としてのプロリン残基を含むジペプチドの欠落は、特定のペプチダーゼ、すなわち、いわゆるジペプチジル（アミノ）-ペプチダーゼIV（DP IV又はDAP IV又はCD 26）が、敗血症のケースで検出されるプロカルシトニン3-116の生成に役割を果たすかもしれないという推測を導く。

#### 【0010】

全身性感染又は敗血症と関連してジペプチジル（アミノ）-ペプチダーゼIVの可能な役割を決定するために、発明者は実験により、前記生理的DAP IV濃度と敗血症の検出と相関関係があるのかどうかについての試験を行っている。得られた結果は相関関係を示した。

#### 【0011】

より正確に得られた結果はさらに、敗血症及び全身性感染のケースの高濃度のプロカルシトニンの発生は孤立した現象ではなく、同様に、他のプロホルモンもまた高濃度で測定可能であり、その結果、そのようなプロホルモンの測定が、プロカルシトニン測定に代えて可能であるか又は個々のケースのプロカルシトニン測定を補足するか、もしくは、さらにそれを診断上の意義のある方法で確認する

のに適している、という仮説の展開をもたらした。

#### 【0012】

敗血症のケースの患者血清中に見出されるのが、完全なプロカルシトニン1-116ではなく、短くなったプロカルシトニン3-116であるとの発見も、敗血症治療にとって潜在的な興味ある問題である。Eric S. Nylenらの論文*Crit Care Med* 1998, Vol. 26, No. 6, 1001-1006頁は、プロカルシトニンが炎症反応を維持し且つ増強するという事実に基づいて、敗血症のケースで生じているプロカルシトニンが、例えば代謝排泄物として形成される、診断上重要なマーカーであるというだけでなく、感染によって引き起こされる炎症過程におけるメディエーターとしての活性な役割を果たしているらしいことを示す、実験による発見を記載している。プロカルシトニンのこの役割は現在、論争の課題であり、その開示された試験結果は同意できる説明を与えていない。

#### 【0013】

アミノ末端でアミノ酸2つ分短くされたプロカルシトニンが敗血症のケースで生じているという上述の発見は、敗血症及び他の炎症性全身性感染のケースで活性な役割を果たすプロカルシトニンがおそらくこの短くされたプロカルシトニン3-116であり、また、完全な長さのプロカルシトニンペプチドを用いて行われた研究が、とりわけこの理由で、異なった又は矛盾した結果を与えたことを示唆している。多数の生理活性ペプチドが、開裂、例えば短いペプチド残基の最初の脱離、によってそれらの実際の活性形態に変換されることは周知である。既知の例はアンギオテンシンであり、著しく異なった生理活性を有するペプチドが、最初にテトラペプチド、次にジペプチド、そして最後に単独のアミノ酸の、連続的な脱離によって、14のアミノ酸を有する不活性なアンギオテンシノーゲンから形成される。その生理活性ペプチドのN-末端の比較的わずかな変更が、免疫学的過程で役割を果たし、対応するペプチドの活性にかなりの変化をもたらすことができるという事実は、ごく最近の数多くの出版物によって確認されているが、敗血症の病理的プロセスに対する言及はなされていない（例えば、*J. Immunol* 1998, Sept. 15, 161 (6): 2672-5; *Biochemistry* 1998, Sept. 8, 37 (36): 12672-80; *FEBS Lett* 1998, July 31, 432 (1-2): 73-6; *L. Biol Chem* 1998, Ma

rch 27: 273 (13): 7222-7; J Exp Med 1997, Dec 1: 186 (11): 1865-72)。

#### 【0014】

##### 【発明の実施の形態】

プロカルシトニン3-116が実際に炎症過程と関連し、特異的分子レセプター又は類似した特異的バインダーがこの短くされたプロカルシトニンに対して存在するのであれば、プロカルシトニン3-116の使用、又は、プロカルシトニン3-116のレセプターと相互作用するアゴニスト及びアンタゴニストの使用によって、敗血症の進行に影響を与え、それがきっかけとなって起こる生理反応に、そして炎症過程にも影響を与えることができる新規な治療の可能性が開かれる。プロカルシトニン3-116の特異的バインダー、例えば、選択的抗体、の使用は、ここで伝えられる発見によって明らかにされる治療アプローチでもある。

#### 【0015】

結局、敗血症及び全身性感染のケースでジペプチジルアミノペプチダーゼIVがプロカルシトニン3-116の生成に役割を果たすかもしれないということは、更なる仮説、すなわち、例えば適当な選択的バインダー、抗体又は類似のレセプター分子によってそれをブロックすることによりジペプチジルアミノペプチダーゼIVの活性に影響を与え、それによって、敗血症及び敗血症様炎症過程に治療上の影響を与えることも可能かもしれないという仮説を導く。

#### 【0016】

この特許出願の目的は、特許法下において、上述の新規な発見及びそこから導かれる結論から生じる新規な技術的教示を、現状の知識水準を考慮した上で、特許保護に到達可能な範囲まで保護することである。

#### 【0017】

特許請求の範囲は、そのような保護可能な教示を暫定的に要約している。当業者にとっては、実験セクションで述べられる実験条件と実験結果、及び、それに関連した説明を考慮した本出願の完全な本文から、さらなる保護可能な教示が生じるかもしれない。そのような教示の特許請求に関しては、補足的な請求項によって明らかに権利が保持される。



## 【0018】

その新規な発見を支持するか又はそこから導かれる仮定の正しさを証明する、選択された実験材料は、いくつかの図を参照して以下に示される。

## 【0019】

図1は、HPLCによる、様々な重度の敗血症患者から集められた血清をプールした血清からのプロカルシトニンの単離及び精製の結果を示す。

図2は、高いプロカルシトニン免疫反応性を有する、図1からのプール血清の各フラクションの質量分光分析結果を示す。

図3は、敗血症血清及び正常な血清中のジペプチジル-アミノペプチダーゼIVの酵素活性の測定結果を示す。

図4は、敗血症血清及び正常な血清中のプロカルシトニンの測定結果を、同じ血清中のさらなるプロホルモン、すなわちブローガストリン放出ペプチド (proGRP) の測定結果と比較して示す。

図5は、健常者20人のグループと敗血症患者20人のグループの血清中のプロカルシトニンの測定結果を示す。

図6は、図5と同じ健常者と敗血症患者の各グループにおける、pro-ANFの測定結果 (pg/チューブ) を示す。

図7は、図5と同じ健常者と敗血症患者の各グループにおける、pro-ADMの測定結果 (pg/チューブ) を示す。

図8は、図5と同じ健常者と敗血症患者の各グループにおける、pro-ENDの測定結果 (pg/チューブ) を示す。

図9は、図5と同じ健常者と敗血症患者の各グループにおける、pro-BNPの測定結果 (pg/チューブ) を示す。

## 【0020】

## 【実施例】

## 実験セクション

A. 敗血症患者の血清からの内因性プロカルシトニンペプチドの単離と確認

重度の敗血症に苦しむ複数の患者からの血清サンプルを混合することによって、総容量68mlの混合血清が調製された。得られたプール血清中のプロカルシトニ

ン濃度は、市販のプロカルシトニンアッセイ (LUMitest PCT, B.R.A.H.M.S. Diagnostica) を用いて測定したところ、28.0 ng/ml (総量 19  $\mu$ g) であった。前記プール血清は、同量のバッファー (68 ml; 10 mM EDTA、1 ng/ml マウス-IgG、2 mg/ml ヒツジ-IgG、2 mg/ml ウシ-IgG、0.1 mmol ロイペプチン、PBS 中 50  $\mu$ M アマスタチン) と混合し、そのサンプル中に含まれるプロカルシトニンを、アフィニティークロマトグラフィーによって単離及び精製した。

#### 【0021】

このために、全てのプールサンプルを、0.5 ml/min の流速で4回、連続して、アフィニティークラム (0.5  $\times$  1 cm、抗カルシトニン抗体、PierceからのCarbolinkに結合、プロカルシトニン結合容量約20  $\mu$ g) に送った。それからそのカラムを30 ml のPBSで洗浄し、結合したペプチドを、50 mM 酢酸 (pH 約2.0) を用いて溶離させた。カラム流出物を280 nmでの吸収を用いて持続的にモニターし、酢酸によって溶離したタンパク質フラクションを集めた (最終容量2.0 ml)。

#### 【0022】

この方法で集められた物質は、rpC<sub>18</sub> カラム  $\mu$ Bondapak 0.4  $\times$  30 mm (Watersより) での逆相HPLCによって精製した。その流速は1 ml/minであり、移動相及び溶離条件は以下の表1に示す。

#### 【0023】

#### 【表1】

表1：プロカルシトニンのrp-HPLCのための溶離条件

移動相A：	5%アセトニトリル 20mM 酢酸アンモニウム		
移動相B：	90%アセトニトリル 20mM 酢酸アンモニウム		
勾配 (Gradient)：	0.0分	100%A	0%B
	2.5分	100%A	0%B
	5.0分	89%A	11%B
	55.0分	56%A	44%B
	60.0分	0%A	100%B

## 【0024】

そのカラム流出物は、214nmでの吸収によって持続的に測定され、0.25mlのフラクションが集められた。市販のプロカルシトニンアッセイ (LUMitest PCT, B.R.A.H.M.S. Diagnostica) を用いて、PCT免疫反応性を検出できたフラクションを決定した。主要な免疫反応性を有する部分が、シャープなバンドとして51番目のフラクションに溶離したことが見出された。加えて、不均一な組成及び低いPCT免疫反応性を有するタンパク質フラクションが、39から49のフラクションにて得られた。

## 【0025】

図1は、前記rp HPLCの、集められた各フラクションについて決定され、溶離したフラクションの吸光度 (OD) を示す曲線に重ね合わせたPCT免疫反応性 (ng PCT/mlで表される) を示す。

## 【0026】

ポジティブなプロカルシトニン免疫反応性を有する全てのフラクションを、窒素ガス処理によって乾燥させた。その後、それらのサンプルをマスマスペクトロメトリーで分析し、N-末端塩基配列決定を行った。

## 【0027】

前記マスマススペクトロメトリー分析 (MSLDI-TOF法) では、図2に示されるプロファイルが、フラクション50-52に対して得られ、そのプロファイルから、 $12640 \pm 15$  のモル質量という結果となった。マスマススペクトロメトリーで調べられた他のフラクション (36-49、53-59) はすべて、 $12640$  未満のモル質量で不均一な質量分布を示した。それらの個々の質量は、フラクション50-52の質量の強度と比べて2%未満の強度を与えた。このように、敗血症患者血清中のプロカルシトニン免疫反応性が、 $12640 \pm 15$  の質量と関連があることが示された。

#### 【0028】

フラクション36-59中に含まれるペプチドのN-末端塩基配列決定を行った。ここでも、フラクション36-49及び53-59の内容が不均一であると証明された。すなわち、N-末端の多様性が測定された。

#### 【0029】

その優勢なプロカルシトニン免疫反応性がわかったフラクション50-52では、そこに含まれるペプチドが明らかに以下のN-末端 (15のアミノ酸) :  
Phe Arg Ser Ala Leu Glu Ser Ser Pro Ala Asp Pro Ala Thr Leu  
を有することが明らかになった。

#### 【0030】

それから、フラクション50-52からのペプチドは、プロテアーゼGlu-C又はトリプシンを用いて消化され、得られたフラグメントは、SMART-HPLCによってそれ自身は既知である方法で元に戻され、それから、マスマススペクトロメトリーと配列分析によって調べられた。

#### 【0031】

既知のプロカルシトニン1-116のアミノ酸3-116の配列と完全に対応した配列が得られた。その配列の理論上の質量は12627であったが、これはマスマススペクトロメトリーにより測定された $12640 \pm 15$  の質量と一致する。

#### 【0032】

したがって、114のアミノ酸を含み且つプロカルシトニン3-116としてデザインされたプロカルシトニンペプチドが敗血症患者の血液中を循環すること

が示された。そのペプチドは、リン酸化又はグリコシル化等の翻訳後の修飾によって変化しない。

#### 【 0 0 3 3 】

前記プロカルシトニン3-116は、可能性のある内因性プロカルシトニン部分ペプチドとしては、現在に至るまで科学論文で論じられておらず、それゆえに、当業者にとって、今日までに、具体的に、このペプチドを調製し、その性質についてそれを調べる理由もない。しかしながら、上記発見は、今や、遺伝子工学技術によって前記プロカルシトニン3-116の具体的な調製の理由をもたらしている。その調製は以下に記載される。

#### 【 0 0 3 4 】

B. 組み換えプロカルシトニン3-116のクローニング、発現及び精製

##### 1. クローニング

プロカルシトニン3-116（以下、PCT 114と略す）をコードするDNAフラグメントを、適当なオリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCR増幅によって、ヒト甲状腺cDNAプールから単離した。望ましいフラグメントが通常の手法（Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA及びStruhl K（1991）, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York）によってクローニングされ、その正確なヌクレオチド配列がDNA塩基配列決定と、プロカルシトニンをコードする既知のDNA配列との比較とによって確かめられた。

#### 【 0 0 3 5 】

PCT 114をコードするcDNAの発現にはベクターが用いられた。これは、T7プロモーターと、いわゆるpelBタンパク質のシグナルペプチドをコードする領域を含んでいる。このpelBシグナルペプチドは、クローニング及び発現後に形成される融合タンパク質が、発現に用いられた宿主細胞の細胞質を通してそのペリプラズム部分に輸送されることを保証する。この輸送過程では、そのN-末端シグナルペプチドが、膜上に位置するシグナルペプチダーゼによって、同時に分離される（Stader JA及びSilhavy TJ（1990）, Engineering Escherichia coli to secrete heterologous gene products, Methods Enzymol. 185, 166-187）。この手

順は、見出された発現生成物が正確に望ましい配列を有することを保証する。この手順では、他の発現方法では必要とされるN-末端メチオニンは存在しない。

#### 【 0 0 3 6 】

前記タイプのベクターへのPCT 114用のcDNAのクローニング、及びこのベクターによるE. coliの形質転換の後、プロカルシトニン3-116が発現した。発現したプロカルシトニン3-116を有するペリプラズムフラクションが、それ自身は既知の方法で単離した (Neu HC及びHeppel LA (1965), The release of enzymes from Escherichia coli by osmotic shock and during the formation of spheroblasts; J. Biol. Chem. 240, 3685-3692)。遠心 (100, 000g、30分、4℃)、及び、その上澄み液 (0.2  $\mu$ m) のろ過後、得られたる液をアニオン交換クロマトグラフィーによって分離した。プロカルシトニン免疫反応性を有するフラクションは、敗血症血清からのPCT3-116の単離に関して記載されたように、合わされて、逆相HPLCによって精製された。

#### 【 0 0 3 7 】

プロカルシトニン免疫反応性を有するすべてのフラクションは、合わされて、凍結乾燥された。SDS-PAGEを用いてその物質をチェックすることによって示されるように、つまり、得られる物質は少なくとも純度95%である。

#### 【 0 0 3 8 】

プロカルシトニン3-116として発現し、精製されたペプチドの同一性は、マスペクトロメトリーと配列分析によって確認された。

#### 【 0 0 3 9 】

得られた組み換えプロカルシトニン3-116は、新規な組み換えペプチドであり、この形態で、免疫試薬の調製に用いられることができ、また、治療上の適性、あるいは、上述の出版物 (Eric S Nylen, Loc. cit.) との関係で、予防上及び治療上の活性を有するその能力について調べられることができる。

#### 【 0 0 4 0 】

PCTアッセイ用の標準物質の調製のために、上述した、遺伝子工学によるプロカルシトニン3-116の調製方法が、また、完全なプロカルシトニン1-116及びプロカルシトニン2-116の調製にも本質的に同一の形態で用いられた

## 【 0 0 4 1 】

C. 通常のヒト血清及び重度の敗血症患者からの血清中におけるジペプチジル-アミノペプチダーゼIV (DAP IV) 活性の測定

健常者から、及び、敗血症患者からの、それぞれ20の血清サンプルを、それらのジペプチジル-アミノペプチダーゼIV特異的酵素活性について調べた。このDAP IV酵素活性は、Lys-Pro-4-メトキシ-ベータ-ナフチルアミドを用いる。それ自身は既知の方法で、フルオロメトリーによって測定した。このために、各ケース、2  $\mu$  lの血清が3 mlの基質 (50  $\mu$  g/ml Lys-Pro-4-メトキシ-ベータ-ナフチルアミド、50 mM Tris/HCl、pH 7.5) を用いてテストされ、340 nmの波長を有する光による励起で生じた蛍光は、410 nmの放射波長で持続的に測定された。その蛍光シグナルは、4-メトキシナフチルアミン溶液を用いて校正された。この方法で決定された酵素活性は、nmol/minで記載される。

## 【 0 0 4 2 】

得られた結果を図3に示す。

## 【 0 0 4 3 】

敗血症血清中のDAP IV酵素活性が実質的に、健常者血清 (血液提供者の血清) 中の活性よりも低いことは明確である。つまり、血漿又は血清中のDAP IV酵素活性の決定は、患者血清中の敗血症を検出するために用いることもできる。

## 【 0 0 4 4 】

敗血症のケースでの、実質的に減少したDAP IVの血漿濃度は、一方では、該DAP IVが敗血症のプロセスに関与している証拠として考えることができる。他方では、それらの結果は、プロカルシトニン3-116の形成に責任があるのが血漿中のDAP IV濃度ではないことを示している。どちらかといえば、得られた結果は、プロカルシトニン3-116が、おそらく細胞内で、組織又は細胞結合DAP IVによって形成され、プロカルシトニン生成細胞又はプロカルシトニン貯蔵細胞から遊離されるという結論を示唆している。

## 【 0 0 4 5 】

DAP IVが活性化T細胞から発現するという効果についての文献 (cf. Hegen及

びOravec, Protein Reviews on the WEB; Fleischer, loc. cit.) に含まれる情報は、DAP IVの発現と免疫系の活性状態との間の密接な関係を示しており、これは、敗血症全身性感染のケースでは過剰なストレス下であり、それゆえに、とりわけプロカルシトニン3-116の形成が非常に増加するという、それら自身を表す典型的な反応を示す。

#### 【 0 0 4 6 】

上述の発見から生じる可能性とは別に、敗血症診断の過程でのDAP IVの測定にとって、上述の結果はまた、敗血症においてカスケード様の様式で生じるプロセスがDAP IVインヒビターによって治療上の影響を受け、その結果、敗血症下でのプロカルシトニン3-116及び他のホルモンあるいは変換されたプロホルモンの遊離を予防又は減少させることが可能であろうということを示し、このプレホルモンの遊離に対して、減少又は予防されるべきという病理学的結論を可能にしているのかもしれない。

#### 【 0 0 4 7 】

##### D. 敗血症のケースにおけるプロカルシトニン以外のプロホルモン濃度の測定

敗血症のケースで放出されるのが完全なプロホルモンのプロカルシトニンではなく、Xaa-Proジペプチドの分短くなった変性プロホルモンであるという事実は、敗血症のケースで放出されるのはプロカルシトニン3-116だけではなく、プロカルシトニン3-116は単に、例えば、免疫調節能を有するものであり、敗血症のケースではおそらく変換形態で高度に遊離されるプロホルモン又は同様のペプチド全体の中の代表的な1つにすぎないという仮説を導く。

#### 【 0 0 4 8 】

既知のプロホルモン及びこれらのプロホルモンに関する文献に述べられるアミノ酸配列のチェックによって、事実上最も良く知られたプロホルモンが、そのアミノ末端に、Xaa-Proと定義されることができ且つそれゆえにプロカルシトニンの場合に見られたのと同様に除去され得るジペプチドを有することが示された。特に、前記タイプのジペプチドは数多くのプロホルモン又は免疫調節体 (immunomodulators) のアミノ末端に存在する。下記の、表の形態の文献データのリストは、いくつかの選択されたプロホルモン又は免疫調節体、それらのアミノ末端に



見出されるジペプチド、及び、それらのアミノ酸総数の概要を示す。

【 0 0 4 9 】

表2に示されるプロホルモンは、敗血症のケースで濃度が上昇するかもしれないプロホルモンの例であるが、そのリストは網羅的なものとみなされるべきではない。免疫調節体の場合、ジペプチドの脱離はその活性に影響するであろう。

【 0 0 5 0 】

【 表 2 】

プロホルモン/ 免疫調節体	N-末端のジペプチド	全アミノ酸の総数
ブローエンドセリン-1 (pro-END)	Ala Pro	195
ブロー脳ナトリウム排泄増加性ペプチド (pro-BNP)	His Pro	108
ブロー心房性ナトリウム排泄増加性 ペプチド (pro-ANP : 又はブロー心房 性ナトリウム排泄増加性因子 pro-ANF)	Asn Pro	128
ブローレプチン	Val Pro	146
ブローニューロペプチドY	Tyr Pro	69
ブローソマトスタチン	Ala Pro	92
ブローニューロペプチドYY	Thr Pro	69
インターロイキン6	Val Pro	183
インターロイキン10	Ser Pro	160
ブローガストリン放出ペプチド (pro-GRP)	Val Pro	115
ブローオビオメラノコルチン	Trp Cys	241
ブローアドレノメデュリン (pro-ADM)	Ala Arg	164
プロカルシトニン (PCT)	Ala Pro	116

【 0 0 5 1 】

今日までの実験による発見は、敗血症等の全身性感染のケースでは、一般的に、インターロイキン等のプロホルモン及びペプチド免疫調節体が、おそらく、ア

ミノ末端でのジペプチドの脱離による変性を伴って遊離されること、並びに、これらがおそらく、関連する特定のレセプター又はその他のバインダーとの相互作用によって、免疫応答のカスケード内の更に次のステップを開始させること示す。

#### 【 0 0 5 2 】

通常の血清と敗血症患者からの血清におけるプロカルシトニン決定と平行して、他のプロホルモンの決定も行った。これらは公平に、ランダムに選択された。これらは、(i)プローガストリン放出ペプチド (proGRP)、(ii)プロー心房性ナトリウム排泄増加性ペプチド (pro-ANP又はpro-ANF)、(iii)プローアドレノメデュリン (pro-adrenomedullin, pro-ADM)、(iv)プローエンドセリン (pro-END) 及び(v)プロー脳ナトリウム排泄増加性ペプチド (pro-BNP) であった。

#### 【 0 0 5 3 】

##### D.1. 敗血症患者からの血清及び健常者からの血清中のproGRPの決定

アッセイは、proGRP決定用のものが市販されている。近年の出版物に、proGRPが気管支の小細胞癌の腫瘍マーカーとして記載されている (Petra Stieber et al., J Lab Med 1997, 21 (6): 336-344)。proGRPの決定用アッセイは、トーネンコーポレーションのProGRP ELISA KIT<sup>TM</sup>の名称のものが市販されている。

#### 【 0 0 5 4 】

このキットを用い、この市販のキットの使用のための情報にて指定された手順に従って、図4に示す測定結果が得られた。

#### 【 0 0 5 5 】

プロカルシトニン及びproGRPについて得られた値の比較は、正常な血清と敗血症の血清との間の差違が、プロカルシトニンの場合よりも明確であること、しかし該proGRP濃度がプロカルシトニンの濃度と同様に上昇することを示している。

#### 【 0 0 5 6 】

##### D.2. 敗血症患者からの血清及び健常者からの血清中のpro-ANF、pro-ADM、pro-END及びpro-BNPの決定

プレホルモンであるpro-ANF、pro-ADM、pro-END及びpro-BNPの決定については、アッセイは、DRG (DRG Instruments GmbH, D-35018 Marburg, ドイツ) からキ

ットの形態で市販されており、製造者の指示に従って次の測定に用いられた。

【 0 0 5 7 】

特に、以下のものが用いられた。

【 0 0 5 8 】

pro-ANFの決定には、Prepro-ANF 26-55 (ヒト) RIAキット；pro-ADMの決定には、Pro-Adrenomedullin 45-92 (ヒト) RIAキット；pro-ENDの決定には、Prepro-Endothelin 18-50 (ヒト) RIAキット；及び、pro-BNPの決定には、Prepro-BNP 22-46 (ヒト) RIAキットであり、これらは上述のDRG社のものである。

【 0 0 5 9 】

20人の正常者A-Tの群の血清及び敗血症患者20人の血清において、上述のプロホルモンと、それらと同時に、プロカルシトニンとを決定した。その結果は以下の表3に要約されている。表3のデータは、図5から9にグラフでも示している。

【 0 0 6 0 】

示された結果は、正常者に比べると、敗血症患者のケースでは、測定されたプロホルモン全ての値でおおよそ明確な増加を示すが、正常者と敗血症患者の間の差違はプロカルシトニンの決定において最も際立っている。

【 0 0 6 1 】

補足的な文献検索によって、さらに、敗血症性ショックにおけるプロオピオメラノコルチン (POMC) 関連ペプチドの確認に関する出版物J. Endocr. (1988) 119, 159-165頁が明らかになった。該出版物は、敗血症性ショックにおける内因性オピオイド活性の増加に関する疑問、及び、ステロイドの投与による選択性の影響を検討している。感染プロセスの直接の影響又は抗生物質による測定値の影響は論じられていない。前記出版物における問題に基づいては、他のプロホルモンペプチドを含む報告結果の一般化された議論について、論理的な実現可能性はない。ここに開示される本発明の教示に照らすと、前記出版物は、敗血症のケースにおける一般的なプロホルモンの増加をさらに示したものとして回顧的に解釈することができる。

【 0 0 6 2 】

さらなるプロホルモンをテストすることは、ここに開示された結果を見ると決まり切った測定であると思なされるべきであり、もしそのようなテストがポジティブな結果を導き、それによってさらなるプロホルモン決定が敗血症の診断に用いられるのであれば、本出願の教示の使用によるものであるであろう。

【 0 0 6 3 】

【 表 3 】

		PCT [ng/ml]	Pro-ANF [pg/ tube]	Pro-ADM [pg/ tube]	Pro-END [pg/ tube]	Pro-BNP [pg/ tube]
	<u>正常</u> <u>患者:</u>					
5	A	0.07	69.4	64	29.3	31.1
	B	0.26	26.6	50.2	15.4	30.1
	C	0.10	14.7	1.0	1.0	24.7
	D	0.06	53.2	77.8	19.3	27.4
	E	0.06	51.1	66.5	20.6	25.4
	F	0.04	95.5	53.5	28.2	28.9
10	G	0.07	117	83.5	18.3	17.3
	H	0.10	88.1	52.3	25.1	28.1
	I	0.10	69.4	107	23.2	25
	J	0.07	38.3	91.1	26.1	25.7
	K	0.06	111	64.9	22.8	29.6
15	L	0.09	73.8	66.3	32.4	21.6
	M	0.07	42	58.9	27.1	23.7
	N	0.09	107	114	27.3	31.2
	O	0.10	56.7	62.5	20.3	26.2
	P	0.10	47.2	51.7	24.5	33.3
20	Q	0.12	155	72.5	34.6	36.7
	R	0.13	92.1	64.7	29.6	35.2
	S	0.12	153	100	34.7	36
	T	0.11	78	69.6	27.1	37.7
	<u>敗血症</u> <u>患者:</u>					
25	13a	1.1	333	195	70	34.9
	10a	11.9	62.5	154	30.5	30.4
	18b	6.4	323	209	75.4	46.4
	19b	21.2	346	180	71.6	50.7
30	8a	1.8	303	203	70.3	48.8
	9a	24.7	271	205	78.4	33.6
	9b	29.0	305	210	62.5	40.3
	12b	5.8	324	204	67.4	36.1
	10b	1.9	127	128	30.5	33.9
35	16a	86.7	347	198	83.3	39
	8b	1.1	138	153	29.6	33.7
	20a	1.4	167	176	41.3	30.9
	20b	1.1	170	178	39	34.9
	13b	0.8	295	186	45.3	36.9
40	19a	17.6	354	201	58.6	54.5
	7b	2.5	356	199	78.6	
	7a	2.9	345	197	148	
	16b	40.0	343	197	88.1	43.9
	12a	5.2	327	216	76.1	34.3
45	15b	1.9	420	215	82.5	52

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 HPLCによる、様々な重度の敗血症患者から集められた血清をプールした血清からのプロカルシトニンの単離及び精製の結果

【図2】 高いプロカルシトニン免疫反応性を有する、図1からのプール血清の各フラクションの質量分光分析結果

【図3】 敗血症血清及び正常な血清中のジペプチジル-アミノペプチダーゼIVの酵素活性の測定結果

【図4】 敗血症血清及び正常な血清中のプロカルシトニンの測定結果を、同じ血清中のさらなるプロホルモン、すなわちプーロガストリン放出ペプチド (proGRP) の測定結果と比較

【図5】 健常者20人のグループと敗血症患者20人のグループの血清中のプロカルシトニンの測定結果

【図6】 図5と同じ健常者と敗血症患者の各グループにおける、pro-ANFの測定結果 (pg/チューブ)

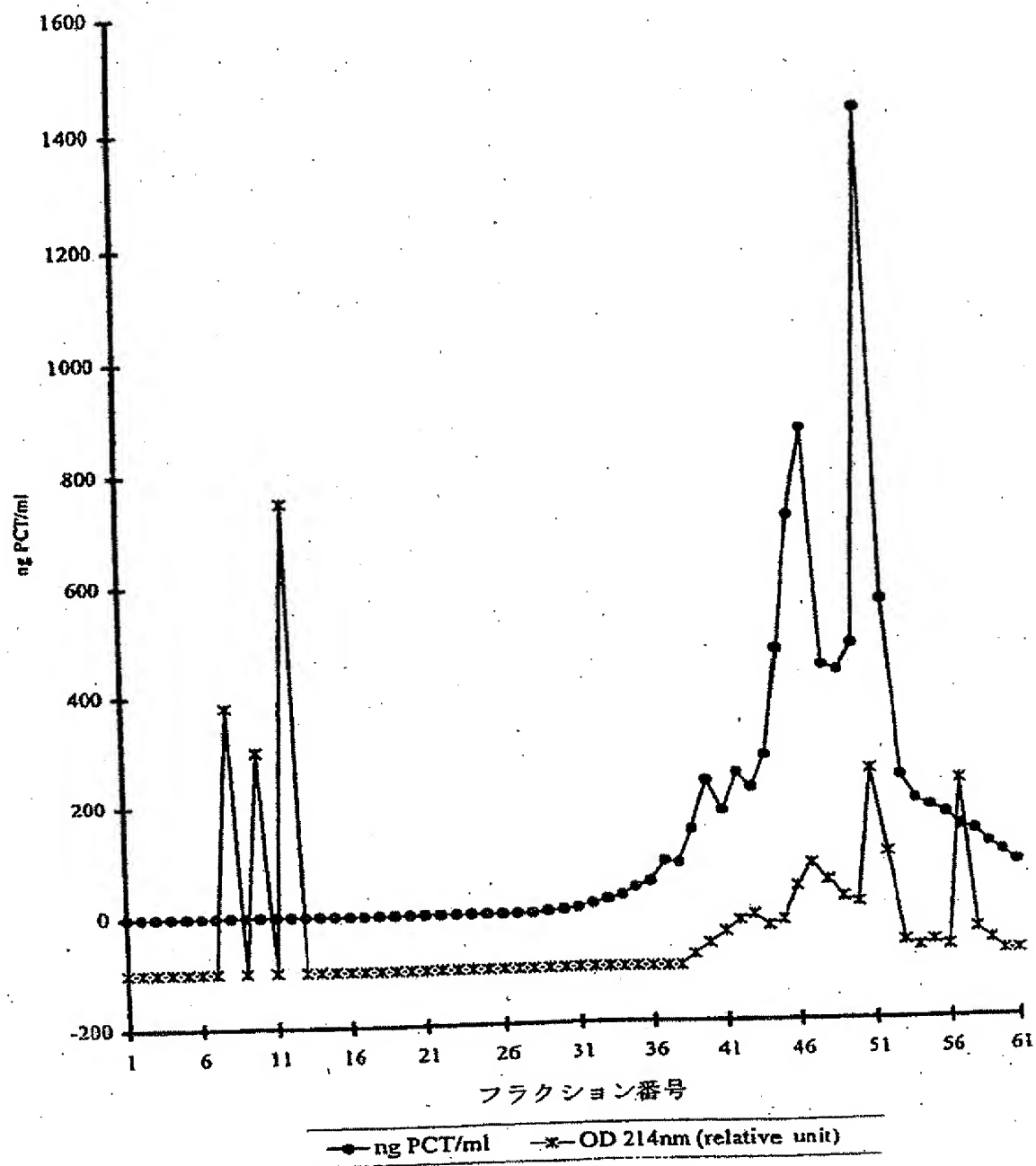
【図7】 図5と同じ健常者と敗血症患者の各グループにおける、pro-ADMの測定結果 (pg/チューブ)

【図8】 図5と同じ健常者と敗血症患者の各グループにおける、pro-ENDの測定結果 (pg/チューブ)

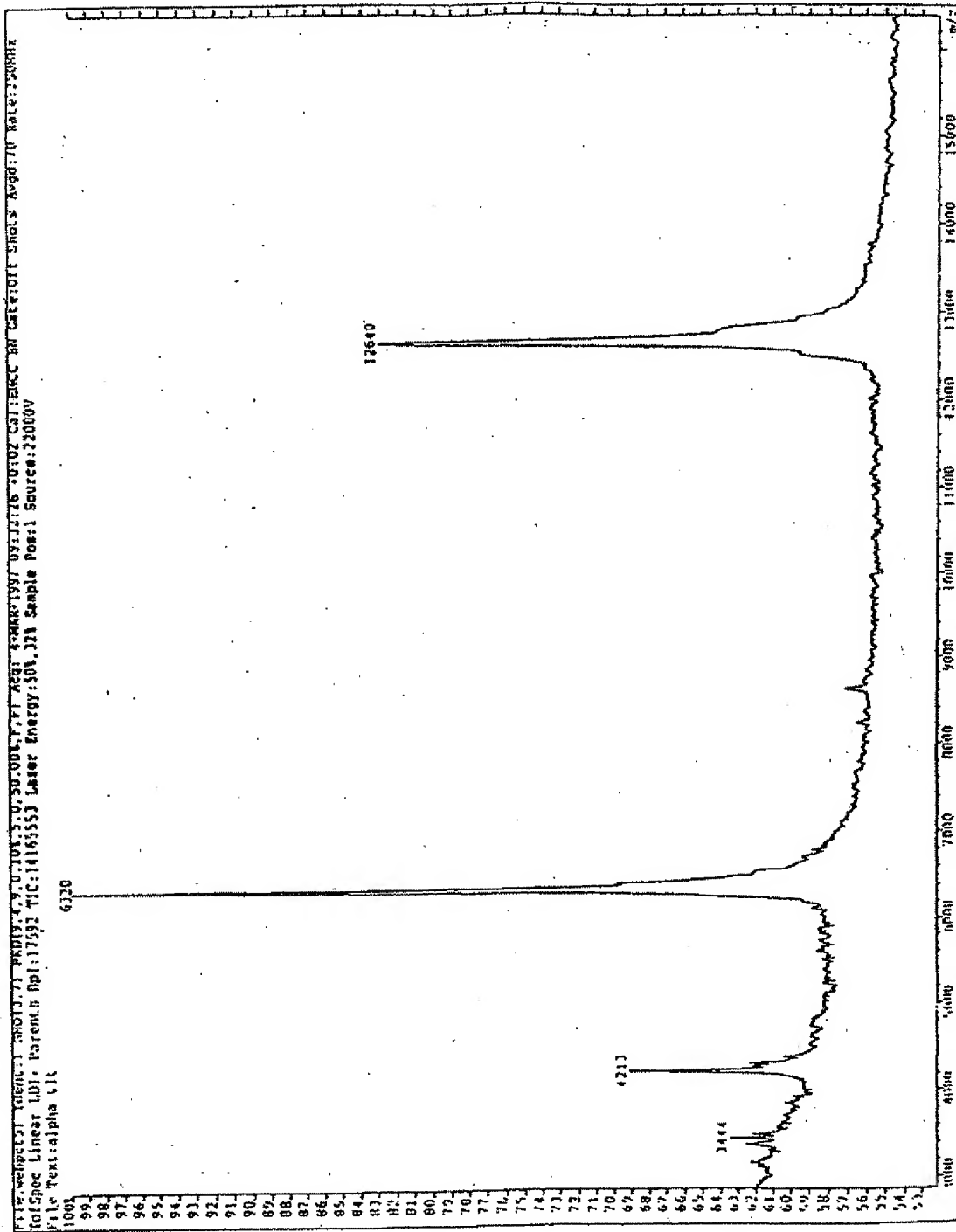
【図9】 図5と同じ健常者と敗血症患者の各グループにおける、pro-BNPの測定結果 (pg/チューブ)

【 図 1 】

## アフィニティー精製ヒトPCTのHPLC精製



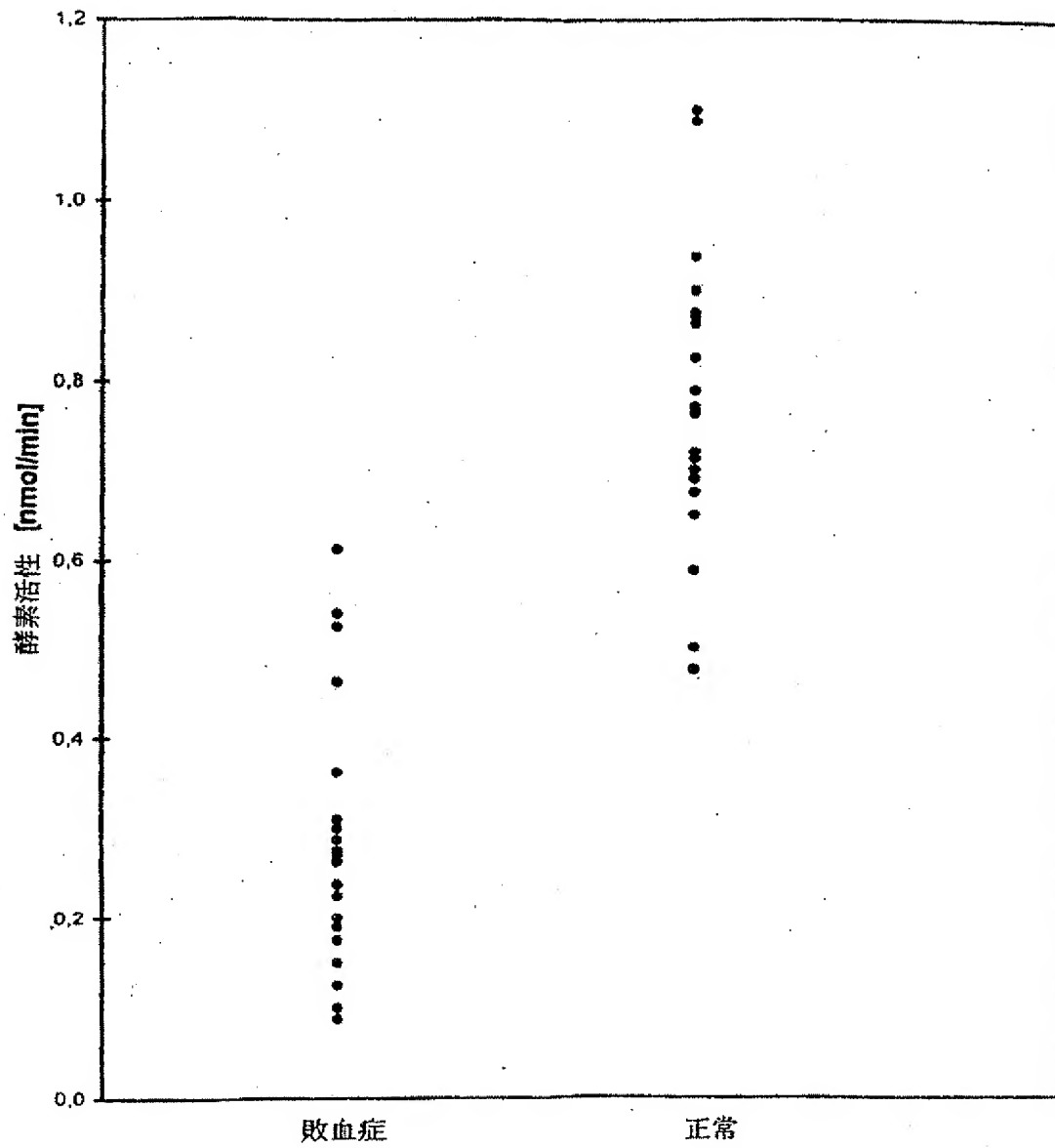
【 2 】



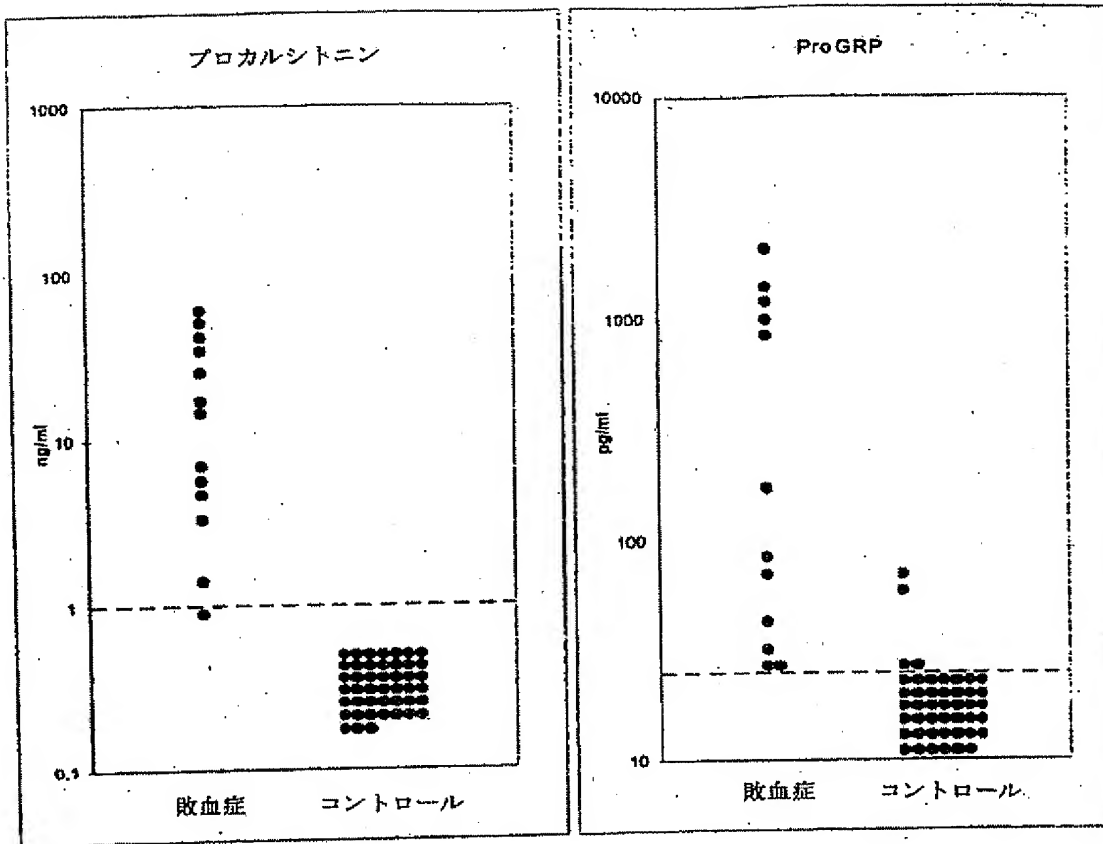


【 図 3 】

敗血症血清 対 血液提供者血清のDAP IVの酵素活性



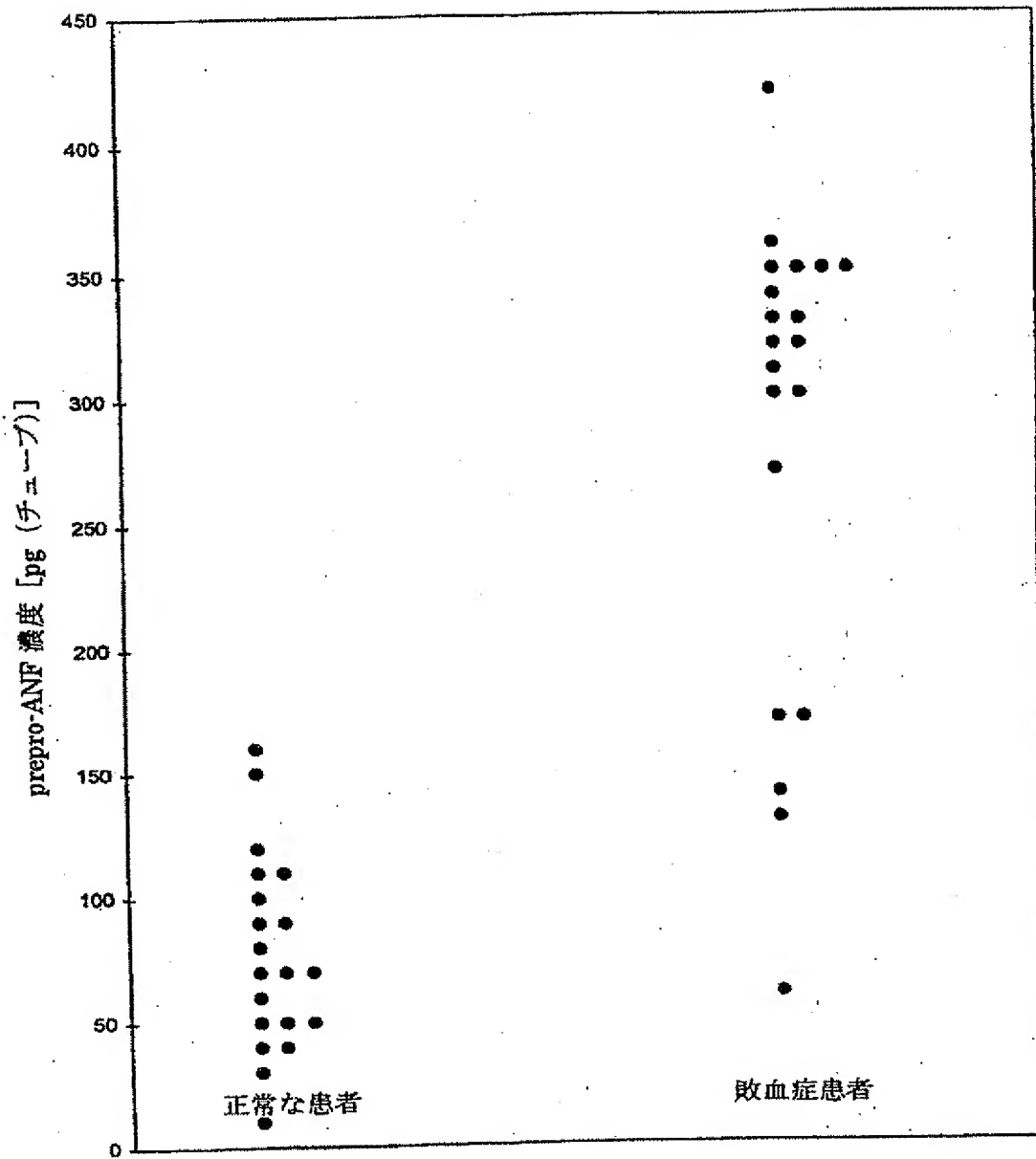
【 図 4 】



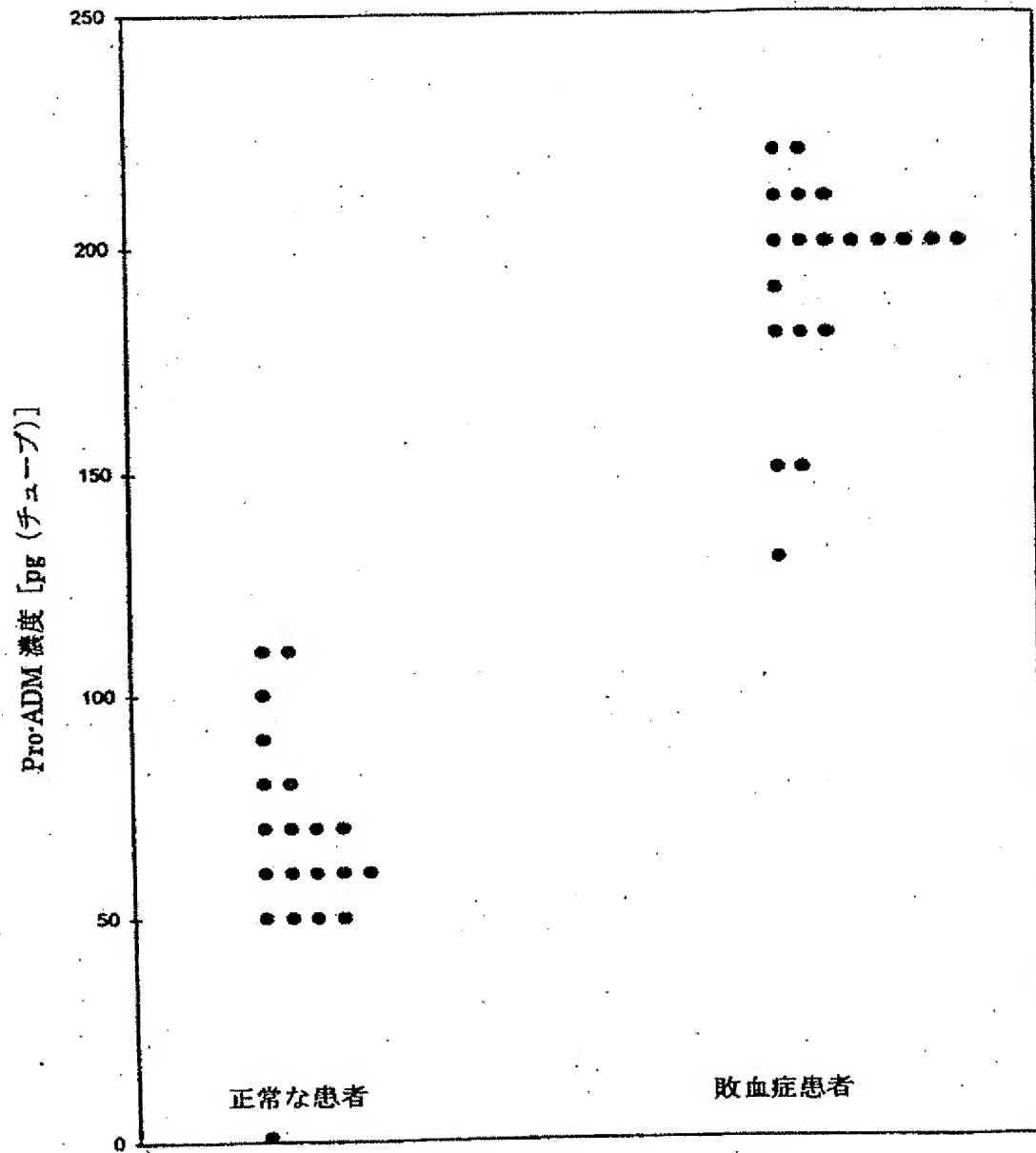


【図 6】

正常な患者対敗血症患者の prepro-ANF (26-55) 濃度の比較

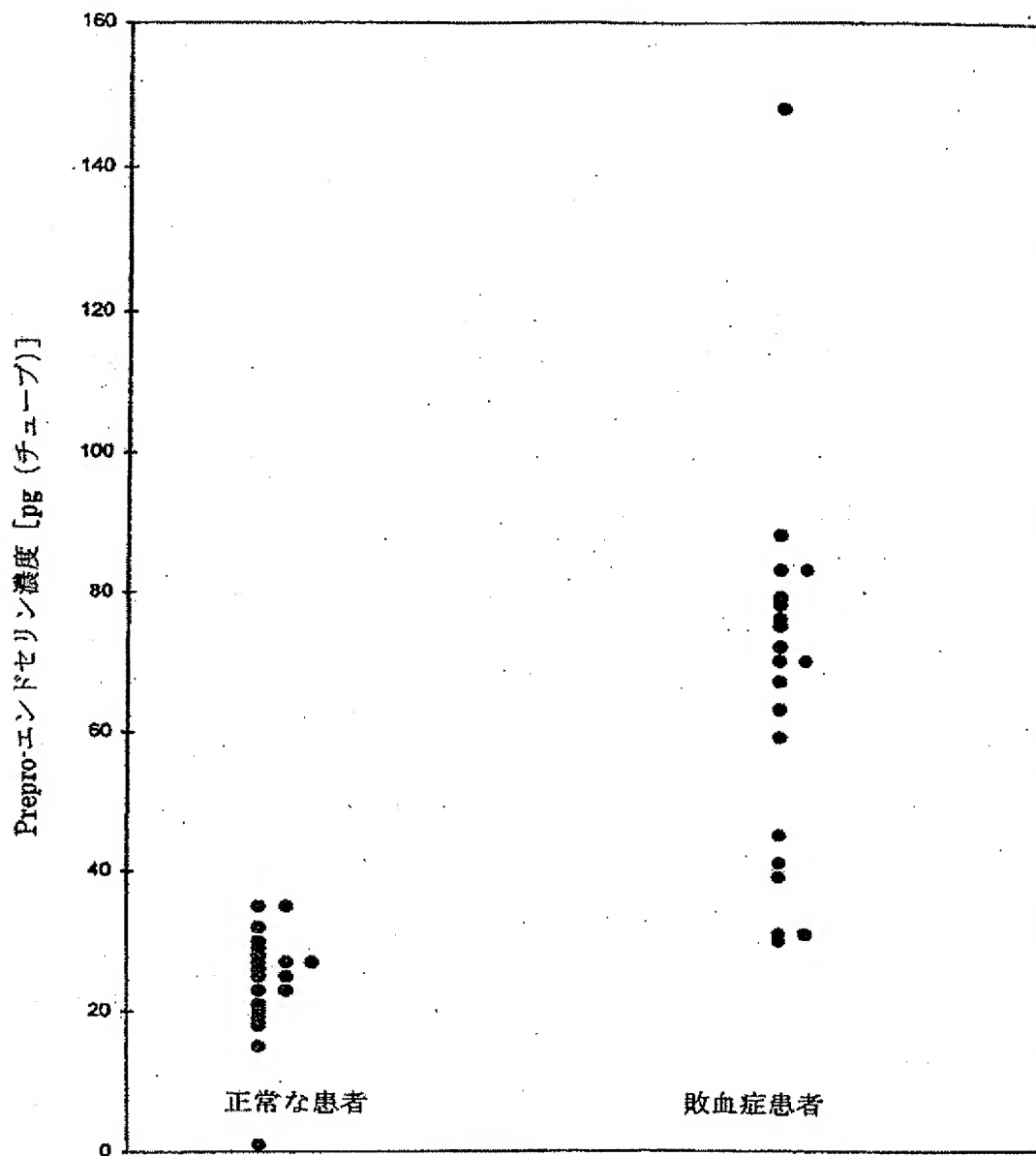


正常な患者対敗血症患者のプロードレノメデュリン(45-92)濃度の比較



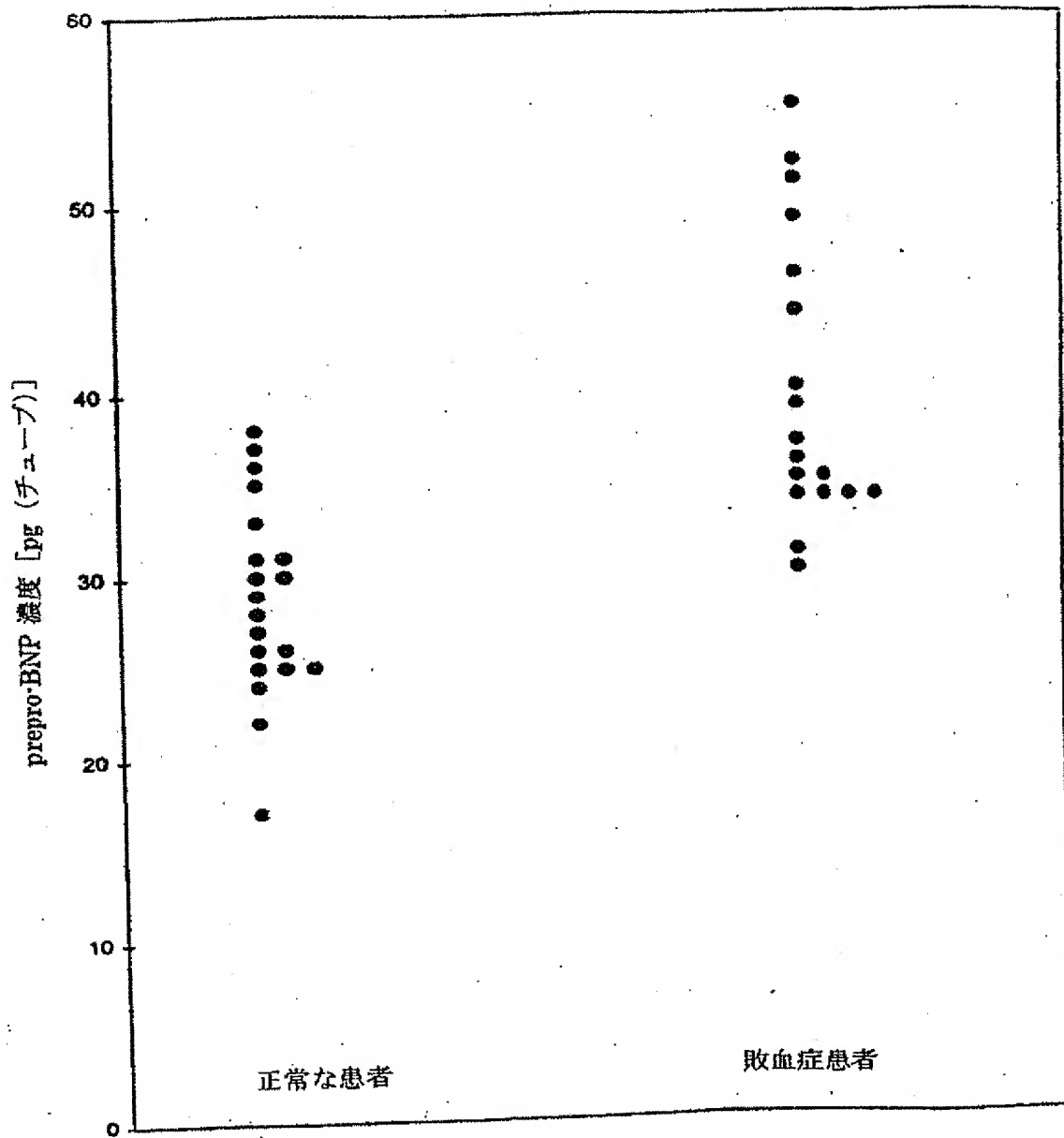
【 図 8 】

正常な患者対敗血症患者の prepro-エンドセリン(18-50)濃度の比較



【 図 9 】

正常な患者対敗血症患者の prepro-BNP (22-46) 濃度の比較



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 99/07692

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/74 C07K14/585 A61K38/23 A61K38/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OKAHARA S ET AL: "SERUM PRO-GASTRIN-RELEASING PEPTIDE (PROGRP) IN SUBJECTS WITH OR WITHOUT HELICOBACTER PYLORI INFECTION" GASTROENTEROLOGY, US, ELSEVIER, NEW YORK, NY, , vol. 110, no. 4, April 1996 (1996-04), page A217 XP000884904 ISSN: 0016-5085 abstract  -/-	1, 2, 5

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 September 2000

Date of mailing of the international search report

18. 09. 2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentstr. 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gundlach, B



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 99/07692

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NORIHARU SHIJUBO ET AL: "ELEVATED PROGASTRIN-RELEASING PEPTIDE (31-98) CONCENTRATIONS IN PLEURAL EFFUSIONS DUE TO SMALL-CELL LUNG CARCINOMA" RESPIRATION,CH,KARGER, BASEL, vol. 63, no. 2, 1 March 1996 (1996-03-01), pages 106-110, XP000608937 ISSN: 0025-7931 page 107, column 1, paragraphs 2,4 page 107, column 2, paragraph 4; figure 1 page 109, column 2, paragraphs 2,3	1,2,5
X	MIYAKE, Y. ET AL.: "Pro-Gastrin-Releasing Peptide(31-98) Is a Specific Tumor Marker in Patients with Small Cell Lung Carcinoma" CANCER RESEARCH, vol. 54, 15 April 1994 (1994-04-15), pages 2136-2140, XP002132024 page 2137, column 1, line 1 - line 7; figure 2	1,2,5
X	GUO Y ET AL: "PRODUCTION OF ENDOTHELINS BY THE VENTILATORY MUSCLES IN SPETIC SHOCK" AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY,US,AMERICAN LUNG ASSOCIATION, NEW YORK, NY, vol. 1, no. 3, September 1998 (1998-09), pages 470-476, XP000879419 ISSN: 1044-1549 page 472, column 2, paragraph 3	1,2,5
A	M'CLOUGHLIN L ET AL: "CHARACTERIZATION OF CIRCULATING PRO-OPiomELANOCORTIN-RELATED PEPTIDES IN HUMAN SEPTIC SHOCK" JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY,GB,BRISTOL, vol. 119, no. 1, October 1988 (1988-10), pages 159-165, XP000879345 ISSN: 0022-0795 cited in the application abstract page 161, column 1, paragraph 2	1,2,5
A	NYLEN E S ET AL: "PNEUMONITIS-ASSOCIATED HYPERPROCALCITONINEMIA" AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES,XX,XX, vol. 312, no. 1, July 1996 (1996-07), pages 12-18, XP000879269 ISSN: 0002-9629 page 15, column 1, line 2 - line 5 page 15, column 2, line 5 - line 9 -/-	1-10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 99/07692

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ASSICOT M ET AL: "HIGH SERUM PROCALCITONIN CONCENTRATIONS IN PATIENTS WITH SEPSIS AND INFECTION" LANCET THE, GB, LANCET LIMITED. LONDON, vol. 341, no. 8844, 27 February 1993 (1993-02-27), pages 515-518, XP000371780 ISSN: 0140-6736 abstract	1-10
A	KARZAI W ET AL: "PROCALCITONIN - A NEW INDICATOR OF THE SYSTEMIC RESPONSE TO SEVERE INFECTIONS" INFECTION, DE, MMV MEDIZIN VERLAG, MUENCHEN, vol. 25, no. 6, November 1997 (1997-11), pages 329-334, XP000879253 ISSN: 0300-8126 page 329, column 2, paragraph 2	1-10
A	DE 42 27 454 C (HENNING BERLIN GMBH) 3 February 1994 (1994-02-03) cited in the application claim 1	1-10
A	QURESHI, N.U. ET AL.: "Endogenous neuropeptide Y mediates vasoconstriction during endotoxic and hemorrhagic shock" REGULATORY PEPTIDES, vol. 75-76, 25 September 1998 (1998-09-25), pages 215-220, XP000925467 abstract page 215, column 1 - column 2, line 3 page 219, column 1, paragraph 3	1-6
A	NORLANDER, T. ET AL.: "Effects of experimental Mycoplasma pulmonis infection on sensory neuropeptides and airway mucosa in the rat" EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL, vol. 10, 1997, pages 2334-2342, XP000925422 abstract page 2341, column 1, paragraph 2	1-6
	-/-	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 99/07692

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KÜLLERTZ, G.: "Die Bedeutung der Aktivitätsbestimmung des Enzyms Dipeptidyl-Peptidase IV (DP IV) im klinischen Laboratorium" LAB. MED., vol. 12, 1988, pages 123-130, XP000933866 page 123, column 2 -page 124, column 1, paragraph 1 page 125, column 1, paragraph 2 - paragraph 3; table 4 page 128, column 1, paragraph 2 page 129, column 1, paragraph 4 - paragraph 5	6
A	VANHAM, G. ET AL.: "Decreased Expression of the Memory Marker CD26 on Both CD4+ and CD8+ T Lymphocytes of HIV-Infected Subjects" JOURNAL OF ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROMES, vol. 6, no. 7, July 1993 (1993-07), pages 749-757, XP000925435 page 751, column 1, paragraph 6 page 753, column 2, paragraph 3 page 756, column 1, paragraph 2	6
A	YARON, A. AND NAIDER, F.: "Proline-Dependent Structural and Biological Properties of Peptides and Proteins" CRITICAL REVIEWS IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, vol. 28, 1993, pages 31-81, XP000925565 page 55, column 1, line 15 -column 2 page 56, column 2, paragraph 2 -page 57, column 1, line 3	1-6
A	ORAYECZ T ET AL: "REGULATION OF THE RECEPTOR SPECIFICITY AND FUNCTION OF THE CHEMOKINE RANTES (REGULATED ON ACTIVATION, NORMAL T CELL EXPRESSED AND SECRETED) BY DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV (CD26)-MEDIATED CLEAVAGE" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, JP, TOKYO, vol. 186, no. 11, 1 December 1997 (1997-12-01), pages 1865-1872, XP002056059 ISSN: 0022-1007 cited in the application the whole document	1-6

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 99/07692

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indicators, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	P PROBST ET AL: "Amino-terminal truncation of chemokines by CD26/Dipeptidyl-peptidase IV" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, vol. 273, no. 13, 27 March 1998 (1998-03-27), pages 7222-7227-7227, XP002102982 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document	1-6
T	WRENGER, S. ET AL: "Amino-terminal truncation of procalcitonin, a marker for systemic bacterial infections, by dipeptidyl peptidase IV (DP IV)." FEBS LETTERS, (JAN. 21, 2000) VOL. 466, NO. 1, PP. 155-159., XP002143500 the whole document	1-10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP99/07692

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

## See Supplemental Sheet

Based on the results of the preliminary examination under PCT Rule 40.2 (e), part of the additional fees is to be reimbursed.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest



The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP99/07692

## ADDITIONAL MATTER

PCT/ISA/210

The International Searching Authority has found that this international application contains several (groups of) invention as follows:

## 1. Claims: 1, 2, 5 (in part)

Method for diagnostic detection of sepsis-like infections using proGRP

## 2. Claims: 1, 2, 5 (in part)

Method for diagnostic detection of sepsis-like infections using pro-END

## 3. Claims: 1, 2, 5 (in part)

Method for diagnostic detection of sepsis-like infections using pro-BNP

## 4. Claims: 1, 2, 5 (in part)

Method for diagnostic detection of sepsis-like infections using pro-ANP

## 5. Claims: 1, 2, 5 (in part)

Method for diagnostic detection of sepsis-like infections using pro-leptin

## 6. Claims: 1, 2, 5 (in part)

Method for diagnostic detection of sepsis-like infections using pro-neuropeptide

## 7. Claims: 1, 2, 5 (in part)

Method for diagnostic detection of sepsis-like infections using pro-somatostatin

## 8. Claims: 1, 2, 5 (in part)

Method for diagnostic detection of sepsis-like infections using pro-ADM

## 9. Claims: 1-10

Method for diagnostic detection of sepsis-like infections using a partial peptide of a prohormone modified by dipeptidyl aminopeptidase IV.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/07692

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4227454 C	03-02-1994	AT 163767 T	15-03-1998
		AU 686114 B	05-02-1998
		AU 4951193 A	15-03-1994
		BR 9306928 A	03-12-1996
		CA 2142599 A	03-03-1994
		CN 1090928 A, B	17-08-1994
		DE 69317289 D	09-04-1998
		DE 69317289 T	08-10-1998
		WO 9404927 A	03-03-1994
		EP 0656121 A	07-06-1995
		ES 2114065 T	16-05-1998
		JP 8501151 T	06-02-1996
		MX 9305028 A	31-05-1994
		NO 950594 A	05-04-1995
		RU 2137130 C	10-09-1999
		SI 9300433 A	31-03-1994
		US 5639617 A	17-06-1997
		ZA 9306042 A	21-02-1994

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/37		(C 1 2 P 21/02	C
//(C 1 2 P 21/02		C 1 2 R 1:19)	
C 1 2 R 1:19)		C 1 2 N 15/00	A

(72) 発明者 ヴォルフガング・ヴェクレナー  
 ドイツ・D-12099・ベルリン・ローレン  
 ツヴェーク・2

F ターム (参考) 4B024 AA11 BA01 CA04 DA06 GA11  
 HA03 HA11  
 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ36 QR48  
 QR58 QS36 QX02  
 4B064 AG15 CA02 CA19 CC24 DA15  
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40  
 DA36 EA52 FA73 FA74 GA23  
 HA05